پیش‌بینی اپی‌توپ‌های پروتئین P24 ویروس HIV-1 سلول T و بررسی اثر آن بر روی تکثیر لنفوسیت‌های انسانی در ایران

آرش رحمانی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. arash.rahmani23@gmail.com

* **حسن محبت کار:** دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران (*نویسنده مسئول). h.mohabatkar@ast.ui.ac.ir

ماندانا بهبهانی: استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. ma_behbahani@yahoo.com

مختار نصرتی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران. mokhtar.nosrati@ast.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً با پیشرفت در زمینه‌ی داروهای تقویت کننده سیستم ایمنی، توانایی بالای پپتیدها در درمان بیماری‌های ویروسی اثبات شده است. یکی از بیماری‌های ویروسی که تاکنون واکسن موثری برای آن تولید نشده است ویروس HIV-1 می‌باشد. چندین مطالعه از کاربرد پروتئین‌های پوششی و کپسیدی پاپیلوما، هرپس و آدنو ویروس در تحریک سیستم ایمنی نشان از اهمیت اپی‌توپ‌های کپسیدی در ساخت واکسن‌های جدید دارد. هدف از پژوهش حاضر پیش‌بینی و اثر بخشی پپتیدهای P24 ویروس HIV-1 در تحریک سیستم ایمنی می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ابتدا توالی پپتیدها از سایت NIBSC دریافت گردید، سپس با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی اپی‌توپ‌های این پروتئین پیش‌بینی شد. به این صورت که ۲۲ پپتید پروتئین P24 با استفاده از سرورهای HLA Pred، Propred، SVMHC، SYFPEITHI و IEDB مورد ارزیابی قرار گرفت. اثر بخشی این پپتیدها در غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی سلول‌های تک لایه خونی محیطی (Iranian blood lymphocyte cells -PBMC) نوع ایرانی بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پپتیدهای مثبت به‌طور قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها شده، اما پپتیدهای منفی تاثیر محسوسی بر لنفوسیت‌های مورد بررسی نداشت. بیشترین افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها مربوط به پپتید شماره ۱۶ و کمترین میزان تاثیر نیز از پپتید ۳ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که ابزارهای پیش‌بینی اپی‌توپ می‌توانند جایگزینی قابل اطمینان برای پژوهش‌های آزمایشگاهی باشند.

کلیدواژه‌ها: اپی‌توپ، لنفوسیت T،HIV-1، P24

مقدمه

در شکل‌گیری یک پاسخ ایمنی مؤثر سلول‌های لنفاوی، سلول‌های التهابی و سلول‌های خون‌ساز دخالت دارند (۱). شناسایی اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک توسط سیستم ایمنی چه اپی‌توپ‌هایی که باعث تحریک سلول‌های T می‌شوند یا اپی‌توپ‌هایی که توسط سلول‌های B و آنتی‌بادی‌های محلول به دام می‌افتند مرحله‌ی کلیدی پاسخ ایمنی ایجاد شده به پاتوژن‌ها است (۲). عوامل متعددی می‌توانند به‌صورت اختصاصی یا غیراختصاصی باعث القای فعالیت سلول‌های T شوند. این سلول‌ها اپی‌توپ‌های خطی را هنگامی‌که مولکول بیگانه توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن هضم می‌شوند شناسایی می‌کنند (۳). باوجود پیشرفت‌های دارویی بیماری‌های ویروسی سالانه باعث مرگ و میر فراوان در جهان می‌شود. یکی از این ویروس‌ها HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) می‌باشد. باوجود این‌که بسیاری از واکسن‌های کاندید در برابر ویروس HIV-1 آزمایش شده‌اند اما تابه‌حال واکسن قوی و مؤثری تولید نشده است (۴ و ۵). پاسخ ایجاد شده توسط لنفوسیت‌های T نقش بسیار مهمی در جلوگیری از پیشرفت بیماری ایدز بازی می‌کند (۶)؛ بنابراین آنتی‌ژن‌هایی که سبب تحریک این سلول‌ها می‌شوند به‌عنوان یک عامل مؤثر در ساخت واکسن به کار گرفته می‌شوند (۷).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

به‌منظور جلوگیری از حضور ترکیبات نامطلوب در بدن و اجتناب از تولید پاسخ‌های هموورال امروزه به جای استفاده از آنتی‌ژن کامل از اپی‌توپ‌های ویروسی که به‌صورت اختصاصی توسط سلول‌های T شناسایی می‌شوند استفاده می‌شود که برای انسان ایمن، دارای قابلیت تولید آسان و همچنین پایداری بالاتری است (۸). چندین گزارش در تولید واکسن بر پایه اپی توپ برای پاپیلوماویروس (۹ و ۱۰)، آدنوویروس (۱۱) و هرپس سیمپلکس (۱۲) وجود دارد. از جمله اجزای ویروس HIV-1 که در بررسی‌های مختلف جهت طراحی واکسن و نیز به‌عنوان تحریک‌کننده سیستم ایمنی جهت افزایش تعداد سلول‌های ایمنی مورد بررسی قرار گرفته است، پروتئین P24 می‌باشد، این پروتئین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سطحی ویروس در روند ایجاد سیکل عفونی و یکی از محصولات برش آنزیمی پلی پروتئین Gag می‌باشد (۱۳). بعضی از نواحی پروتئین P24 دارای اپی‌توپ‌های ثابت است که پاسخ‌های ایمنی قوی ایجاد می‌کند (۴). در مطالعه‌ای که روی سلول‌های دندریتیک و پروتئازوم‌های تخلیص شده سلول‌های +T CD4 صورت گرفته نشان داده شد که این سلول‌ها اپی‌توپ‌های مختلفی از این پروتئین را عرضه می‌کنند که مشابه اپی‌توپ‌های تولیدکننده سلول‌های +T CD8 در افراد آلوده به HIV-1 می‌باشد (۱۴). همچنین استفاده از P24 به‌عنوان داربستی ایمونوژنیک برای آنتی‌ژن‌های توبرکلوزیس نشان می‌دهد که ترکیب اپی‌توپ‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و پروتئین P24 باعث تکثیر سلول‌های T و همچنین ترشح اینترفرون گاما از این سلول‌ها می‌شود (۸). در پژوهشی مشابه مطالعه‌ی بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی اپی‌توپ‌های پیش‌بینی‌شده‌ی پروتئین P24 و پروتئین‌های ویروس مولد آنفلوانزا اثربخشی این اپی‌توپ‌ها را در تحریک سیستم ایمنی تأیید نموده‌اند (۱۵). مطالعه‌ی انجام شده توسط چاکرابورتی و همکاران نیز مشخص نموده که تعین نقشه‌ی اپی‌توپی پروتئین‌های P24 و Nef ویروس HIV-1 می‌تواند گزینه‌ی مناسب جهت توسعه‌ی واکسن‌های مؤثر علیه HIV-1 باشد (۱۶). ابزارهای بیوانفورماتیکی نقش مهمی را در پیشرفت واکسن‌های پپتیدی داشته‌اند (۱۷) این ابزارها به‌ویژه در تولید واکسن برای بیماری‌هایی چون ام اس (۱۸)، مالاریا (۱۹) و واکسن‌های ضد توموری (۲۰) کاربرد زیادی داشته و با به سرعت در حال رشد و توسعه هستند.

ابزارهای پیش‌بینی اپی‌توپ‌های لنفوسیت‌های T به محققان کمک می‌کند تا پپتیدهای اختصاصی را شناسایی کنند. این کار موجب کاهش تعداد پپتیدهای تولیدی و مشکلات مربوط به شناسایی آن‌ها می‌شود. در واقع با این روش نقاطی از آنتی‌ژن که بیش‌ترین احتمال حضور اپی توپ T در آن وجود دارد، پیش‌بینی می‌شود (۱۵ و ۲۱). در این پژوهش با استفاده از ۵ سرور مختلف پپتیدهای مشتق از پروتئین P24 را مورد ارزیابی قرار می‌دهیم و نقاط دارای بیشترین احتمال حضور اپی توپ T را برای MHC I (Major Histocompatibility Complex) شناسایی کرده و در آزمایشگاه این پپتیدها را روی لنفوسیت‌های خونی ایرانی در انسان آزمایش می‌کنیم.

روش کار

پیش‌بینی اپی‌توپ‌های احتمالی پروتئین P24: پپتیدهای P24 از مرکز معرف‌های اچ ای وی در بریتانیا (Centre For Aids Reagents In Uk) گرفته شد. تعداد این پپتیدها ۲۲ عدد است. هریک از آن‌ها دارای توالی‌های ۲۰ اسیدآمینه‌ای بوده که دارای همپوشانی هستند؛ به این صورت که ۱۰ آمینواسید از انتهای پپتید قبلی با ۱۰ آمینواسید در ابتدای پپتید بعدی یکسان است. توالی آمینواسیدی پپتیدهای مذکور از پایگاه داده‌های توالی پروتئین‌ها به آدرس NIBSC دریافت شد.

سپس با استفاده از سرورهای HLA Pred (۲۲)، Propred (۲۳)، SVMHC (۲۴)، SYFPEITHI (۲۵) و IEDB (۲۶) هرکدام از پپتیدهای مشتق از پروتئین P24 ویروس HIV-1SF2 (جدول ۱) به‌صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی هر پپتید به سرور موردنظر داده شد. سرور بر اساس الگوریتم ویژه خود نقاطی به طول ۹ آمینواسید را

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

جدول ۱- توالی پپتیدهای مشتق از پروتئین P24 ویروس HIV-1SF2 و شماره شناسایی مربوط به آن‌ها

ردیف	شماره دسترسی	توالی پپتید	ردیف	شماره دسترسی	توالی پپتید
۱	ARP788.1	PIVQNLQGQMVHQAISPRTL	۱۲	ARP788.12	LQEQIGWMTNNPPIPVGEIY
۲	ARP788.2	VHQAISPRTLNAWVKVVEEK	۱۳	ARP788.13	NPPIPVGEIYKRWIILGLNK
۳	ARP788.3	NAWVKVVEEKAFSPEVIPM	۱۴	ARP788.14	KRWIILGLNKIVRMYSPTSI
۴	ARP788.4	AFSPEVIPMFSALSEGATPQ	۱۵	ARP788.15	IVRMYSPTSILDIRQGPKEP
۵	ARP788.5	SALSEGATPQDLNTMLNTV	۱۶	ARP788.16	LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK
۶	ARP788.6	DLNTMLNTVGGHQAAMQMLK	۱۷	ARP788.17	FRDYVDRFYKTLRAEQASQD
۷	ARP788.7	GHQAAMQMLKETINEEAAEW	۱۸	ARP788.18	TLRAEQASQDVKNWMTETLL
۸	ARP788.8	ETINEEAAEWDRVHPVHAGP	۱۹	ARP788.19	VKNWMTETLLVQNANPDCKT
۹	ARP788.9	DRVHPVHAGPIAPGQMREPR	۲۰	ARP788.20	VQNANPDCKTILKALGPAAT
۱۰	ARP788.10	IAPGQMREPRGSDIAGTTST	۲۱	ARP788.21	ILKALGPAATLEEMMTACQG
۱۱	ARP788.11	GSDIAGTTSTLQEQIGWMTN	۲۲	ARP788.22	LEEMMTACQGVGGPGHKARV

که بیشترین احتمال حضور اپی‌توپ‌های T است معلوم می‌کند و به هرکدام از این نقاط امتیاز مشخصی می‌دهد که در این میان بهترین اپی توپ که دارای بیشترین امتیاز است انتخاب شد. یک استثناء در بین آن‌ها سرور Pred HLA است که اپی توپ را بدون امتیاز مشخصی انتخاب می‌کند، اما در این سرور تعداد نقاط با بیشترین احتمال به‌عنوان اپی توپ T نسبت به سایر سرورها کمتر است یعنی با اطمینان بیشتری اپی توپ را پیش‌بینی می‌کند. در این بررسی از تمام انواع HLA (Antigen Human Leukocyte) مربوط به لنفوسیت‌های انسانی استفاده شده است.

بررسی رشد و تکثیر لنفوسیت با استفاده از روش MTT: برای بررسی اثر پپتیدهای پروتئین P24 بر روی رشد و تکثیر لنفوسیت‌های خونی ایرانی از آزمون MTT استفاده شد. این آزمونی که روش رنگ سنجی است. اساس این روش احیای کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم و ایجاد کریستال های آبی رنگ نامحلول فورمازان توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلولی می‌باشد. شدت رنگ ایجاد شده بر اثر انحلال این کریستال‌ها ارتباط مستقیمی با تعداد سلول‌های موجود در چاهک‌های کشت دارد. به‌منظور انجام تست MTT در ابتدا هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۱۸۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلولی و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف پپتیدهای P24 اضافه شده تا حجم آن به ۲۰۰ میکرولیتر برسد. در این مرحله سلول‌ها را به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار می‌دهیم، سپس به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه می‌کنیم و ۴ ساعت دیگر گرماگذاری ادامه داده شد. بعد از اتمام گرماگذاری لنفوسیت‌ها برای حل کردن کریستال‌های نامحلول MTT از ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۴ مولارتریتون-ایزوپروپانول استفاده شد. در انتها جذب را در طول‌موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه خواننده الایزا اندازه‌گیری شد. در این تحقیق از چاهک‌های حاوی ۲۰ میکرولیتر PBS به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای نمایان شدن تأثیر غلظت‌های مختلف از پروتئین P24 سه بار تکرار انجام داده شد. در نهایت میزان تکثیر لنفوسیت از روش زیر به دست می‌آید.

$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{جذب حاصل از هر نمونه}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times 100$$

یافته‌ها

در جدول ۲ اسامی سرورها و اپی‌توپ‌های پیش‌بینی شده آمده است. اپی‌توپ‌هایی انتخاب شده‌اند که در همه سرورها مشترکند. بر این اساس امتیازی که توسط سرورهای Propred 1، SVMHC، SYFPEITHI در نظر گرفته شده بزرگ‌ترین عدد برای اپی توپ احتمالی در میان سایر اپی‌توپ‌ها است، اما روش امتیازدهی در سرور

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

جدول ۲- اسامی سرورها و اپی توپ های پیش بینی شده و امتیازی که به آن ها تعلق گرفته است.

ردیف	شماره دسترسی	رده بندی و امتیاز پپتید ها در سرور های مختلف							
		HLA Pred MHC I	Propred 1		SVMHC I		SYFPEITHI MHC I		IEDB MHC I	
		اپی توپ پیش بینی شده	اپی توپ پیش بینی شده	امتیاز	اپی توپ پیش بینی شده	امتیاز	اپی توپ پیش بینی شده	امتیاز	اپی توپ پیش بینی شده	امتیاز
۱	APR788.1	MVHQAISPR	MVHQAISPR	۳۶۹,۹۸	MVHQAISPR	۳,۲۹	IVQNLQGQM	۱۶۹	IVQNLQGQM	۳۸
۲	APR788.2	AISPRTLNA	AISPRTLNA	۲۰۰,۳۳	AISPRTLNA	۲,۹۲	PRTLNAWVK	۲۲۶	AISPRTLNA	۱۲,۹۵
۳	APR788.3	AFSPEVIPM	AFSPEVIPM	۴۶۲,۲۸	AWVKVVEEK	۲,۴۴	AFSPEVIPM	۲۱۰	AFSPEVIPM	۳۶
۴	APR788.4	IPMFSALSE	IPMFSALSE	۴۴۱,۱۵	IPMFSALSE	۳,۳۳	EVIPMFSAL	۳۷۹	EVIPMFSAL	۲۳,۵
۵	APR788.5	TPQDLNTML	TPQDLNTML	۱۰۹۹,۵۹	TPQDLNTML	۷,۷۱	SEGATPQDL	۳۳۰	TPQDLNTML	۳۱,۵
۶	APR788.6	DLNTMLNTV	DLNTMLNTV	۴۷۷,۴۱	DLNTMLNTV	۱,۶۲	DLNTMLNTV	۲۲۴	NTVGGHQAA	۱۰,۱۵
۷	APR788.7	AMQMLKETI	AMQMLKETI	۵۷۸,۸۴	HQAAMQMLK	۲,۳۵	AMQMLKETI	۲۱۹	HQAAMQMLK	۲۴,۵
۸	APR788.8	AEWDRVHPV	AEWDRVHPV	۹۰۶,۳۶	DRVHPVHAG	۲,۳۲	AEWDRVHPV	۲۷۵	AEWDRVHPV	۵۲
۹	APR788.9	VHPVHAGPI	VHPVHAGPI	۵۷۷,۵	APGQMREPR	۳,۳۱	VHPVHAGPI	۱۹۱	VHPVHAGPI	۷۲
۱۰	APR788.10	APGQMREPR	APGQMREPR	۴۷۳,۴۴	APGQMREPR	۳,۳۱	EPRGSDIAG	۱۳۱	APGQMREPR	۸۴
۱۱	APR788.11	DIAGTTSTL	DIAGTTSTL	۵۳۳,۵۵	TTSTLQEQI	۰,۴۸	DIAGTTSTL	۳۳۵	TTSTLQEQI	۵,۶
۱۲	APR788.12	NPPIPVGEI	NPPIPVGEI	۱۰۲۷,۹۹	NPPIPVGEI	۷,۶۴	PPIPVGEIY	۲۴۸	PPIPVGEIY	۱۳,۵
۱۳	APR788.13	KRWIILGLN	KRWIILGLN	۳۱۵۲,۷	IPVGEIYKR	۴,۵۱	IPVGEIYKR	۱۹۱	KRWIILGLN	۶۲,۵
۱۴	APR788.14	GLNKIVRMY	KRWIILGLN	۳۱۵۱,۳۲	GLNKIVRMY	۲,۵۲	GLNKIVRMY	۲۷۱	GLNKIVRMY	۶
۱۵	APR788.15	RMYSPTSIL	RMYSPTSIL	۱۵۴۸,۴۷	ILDIRQGPK	۵,۵۲	RMYSPTSIL	۲۹۵	ILDIRQGPK	۱۱,۹
۱۶	APR788.16	FRDYVDRFY	FRDYVDRFY	۸۷۴,۷۵	GPKEPFRDY	۴,۵۲	GPKEPFRDY	۲۴۲	FRDYVDRFY	۱,۰۵
۱۷	APR788.17	YVDRFYKTL	YVDRFYKTL	۷۹۳,۲۳	YVDRFYKTL	۲,۶۸	YVDRFYKTL	۳۴۵	YVDRFYKTL	۴,۳
۱۸	APR788.18	AEQASQDVK	AEQASQDVK	۳۱,۶۲	LRAEQASQD	۱,۸۷	AEQASQDVK	۱۸۵	AEQASQDVK	۷۸,۵
۱۹	APR788.19	VQNANPDCK	VQNANPDCK	۲۲۳,۶۲	VQNANPDCK	۱,۵۵	TETLLVQNA	۲۰۰	VQNANPDCK	۴۲,۵
۲۰	APR788.20	NANPDCKTI	NANPDCKTI	۶۹۸,۹۷	NANPDCKTI	۵,۹۷	NANPDCKTI	۲۴۴	NPDCKTILK	۱۲,۹۵
۲۱	APR788.21	KALGPAATL	KALGPAATL	۹۳۸,۹۷	GPAATLEEM	۴,۶۶	KALGPAATL	۳۷۲	GPAATLEEM	۷۰,۰
۲۲	APR788.22	EMMTACQGV	EMMTACQGV	۵۹۵,۲۷	GVGGPGHKA	۰,۹۷	GVGGPGHKA	۱۷۲	EMMTACQGV	۳۰,۵

IEDB به‌گونه‌ای است که هر چه عدد کمتر باشد، اپی توپ انتخابی دارای ارزش بالاتری است. در HLA Pred امتیازی برای نقاط با احتمال اپی توپ تعیین نمی‌شود، اما تعداد اپی‌توپ‌های احتمالی انتخاب شده بسیار کمتر است.

پس از اینکه بخش‌های ۹ آمینواسیدی که بیشترین احتمال اپی توپ بودن را برای MHC کلاس ۱ داشتند توسط سرورها مشخص شد، بر اساس امتیاز ۴ پپتید که عددهای بهتری دارند به‌عنوان پپتیدهای مثبت و ۴ پپتید دیگر نیز که از همه امتیاز پایین‌تری دارند به‌عنوان پپتید منفی در نظر گرفته می‌شود. توالی‌های انتخاب شده در آزمایشگاه بر روی لنفوسیت‌های خونی ایرانی اثر داده شد و نتایج بخش پیش‌بینی رایانه‌ای با قسمت عملی تحقیق مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج آزمایش در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

پپتیدهای ۵،۱۲،۱۶ و ۲۱ توسط ۵ سرور موردنظر دارای اپی‌توپ‌های بهتری نسبت به دیگر پپتیدها بودند. در بررسی آزمایشگاهی نیز این پیش‌بینی مورد تأیید قرار گرفت. به‌طور مشخص پپتید شماره ۱۶ تا حدود ۴۰٪ باعث افزایش تعداد لنفوسیت‌های انسانی در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد.

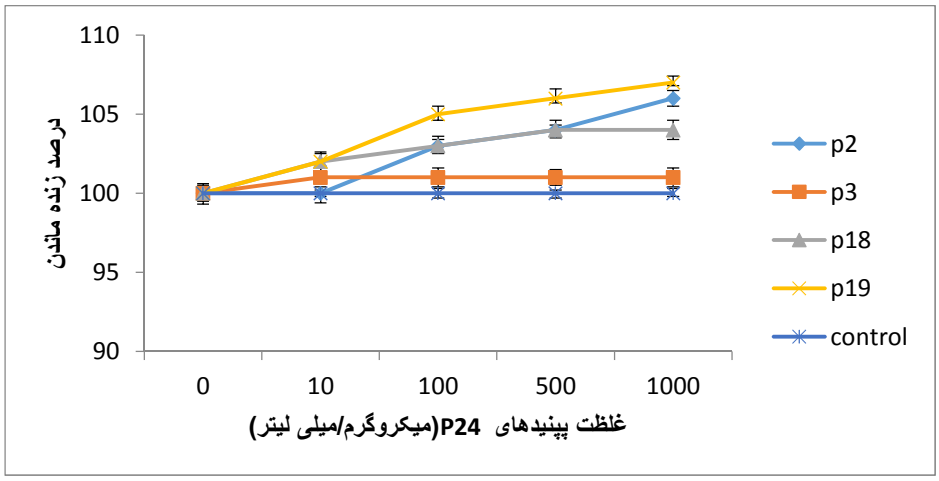
پپتیدهای ۲،۳،۱۸ و ۱۹ در مقایسه با دیگر پپتیدها دارای امتیاز پایین‌تری بودند؛ بنابراین به‌عنوان پپتیدهای منفی در نظر گرفته شد و درصد بسیار اندکی تا حدود ۷٪ باعث افزایش تعداد لنفوسیت‌ها در بررسی آزمایشگاهی شد.

بحث و نتیجه‌گیری

آزمایش‌های بالینی در انسان نشان می‌دهد که با استفاده از اپی‌توپ‌های ویروسی که دارای نقاط ثابت هستند، می‌توان واکسن‌های قوی، با اثربخشی بالا تولید کرد (۲۷). یکی از چالش‌های اصلی در عفونت ایجاد شده با HIV-1 کاهش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

نمودار ۱- درصد بقای لنفوسیت‌ها در غلظت‌های مختلف پپتیدهای مثبت



نمودار ۲- درصد بقای لنفوسیت‌ها در غلظت‌های مختلف پپتیدهای منفی

ایمنی سلولی ناشی از کاهش تعداد سلول‌های ایمنی به‌ویژه سلول‌های $CD4^+$ است. لذا، یکی از رهیافت‌های نوین در درمان و یا کاهش علائم بیماری در HIV-1 افزایش تعداد سلول‌های لنفوسیت در بیماران است. از طرف دیگر به دلیل تنوع بالای سروتایپ‌های مختلف ویروس HIV-1 و تغییر مداوم پروتئین‌های آن تعیین نقشه‌ی اپی‌توپی پروتئین‌های اصلی ویروس مذکور می‌تواند در دست‌یابی به واکسن‌های نوین علیه این عفونت مؤثر واقع شود. در این بین نقشه‌ی اپی‌توپ‌های T به دلیل خطی بودن و امکان تحریک ایمنی سلولی که معضل اصلی در عفونت ایجاد شده توسط HIV-1 می‌باشد، می‌تواند راه‌حلی مناسب جهت طراحی واکسن و یا پپتید-های دارویی با قابلیت تحریک ایمنی سلولی باشد (۲۸). نتایج این پژوهش نشان داد که پپتیدهای حاصل از پروتئین GagP24 دارای خاصیت تحریک‌کنندگی سیستم ایمنی است. این پروتئین از جمله مهم‌ترین اجزای HIV-1 در ایجاد پاسخ ایمنی می‌باشد که دارای اپی‌توپ‌های ثابت با ایمنی‌زایی بالا می‌باشد. به‌علاوه چندین مطالعه در مورد اثربخشی P24 بر روی سیستم ایمنی انجام شده است. ساشا و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک پروتئین Gag در ویروس نقص ایمنی اکتسابی میمون توانایی تولید و تحریک سلول‌های T سیتوتوکسیک CD8+(CTL) را دارد (۲۹). ملهلم و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که افزایش سلول‌های سیستم ایمنی با کاهش ویروس موجود در جریان خون در طول عفونت اولیه مرتبط است (۳۰). در مطالعه‌ای دیگر پروتئین P24 همراه با یک ادجوانت کاتیونی که توانایی تحریک سلول‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

+TCD4 و +CD8 را داشت به موش تزریق شد. این تحقیق نشان داد که پپتیدهای مشتق از این پروتئین همراه با ادجوانت کاتیونی دارای طیف گسترده‌تری از ایجاد ایمنی سلولی در موش‌ها نسبت به پروتئین کامل می‌باشد (۴ و ۳۱). ولی تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر استفاده از پپتیدهای حاصل از پروتئین P24 روی لنفوسیت‌های خونی محیطی صورت نگرفته است.

استفاده از پپتیدهایی که شبه دارو به شمار می‌روند بدون توجه به این‌که طبیعی یا سنتزی باشند به‌صورت پیش‌رونده‌ای در حال افزایش است (۳۲). بر این اساس در پژوهش حاضر از پپتیدهای مشتق از پروتئین کامل P24 استفاده شده است. یکی از روش‌ها برای شناسایی اپی‌توپ‌های سلول‌های T استفاده از مدل‌های پیش‌بینی کننده کامپیوتری است، که اساس آن‌ها تمایل اتصال به مولکول‌های MHC می‌باشد. امروزه اپی‌توپ‌های بسیاری با استفاده از توانایی اتصال به HLA پیش‌گویی شده‌اند (۳۳ و ۳۴). دو دسته اصلی از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی پپتیدهای متصل شونده به MHC در دسترس هستند که دسته اول مبتنی بر شناسایی الگوهای موجود در توالی پپتیدهای متصل شونده است و دسته دوم ساختارهای سه‌بعدی را برای مدل‌سازی میان کنش MHC و پپتید به کار می‌گیرند. استفاده از روش‌های مبتنی بر ساختار به دلیل پیچیدگی بالا و روش‌های محاسبه طولانی ما را به سمت دسته اول یعنی الگوهای موجود در توالی پپتید سوق می‌دهد (۱۹ و ۳۵). در این مطالعه با استفاده از سرورها تمایل اپی‌توپ‌های پروتئین P24 برای تمامی HLAهای مربوط به MHCI لنفوسیت‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به امتیاز داده شده توسط سرورهای Propred1، SVMHC، SYFPEITHI، IEDB و HLA pred اپی‌توپ‌های این پروتئین برای سلول‌های T مربوط به MHC کلاس ۱ پیش‌بینی شد. سرورهای مذکور در مطالعات مختلفی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این میان یکی از سرورهایی که به‌صورت گسترده برای پیش‌بینی اپی توپ‌ها استفاده شده SYFPEITHI است که بر اساس جستجوی موتیف پروتئین عمل می‌کند (۲۳ و ۳۶). در این سرور توالی آمینواسیدی پپتید با استفاده از کتابخانه موتیف مورد بررسی قرار گرفته تا موتیف های آن شناسایی شود. موتیف های متصل شونده به MHC برای پپتید داده شده با مقایسه توالی‌های اتصالی و غیر اتصال شونده‌ها به دست می‌آید (۳۷ و ۳۸).

در پژوهش حاضر اپی توپ‌ها بر اساس بیش‌ترین امتیازی که توسط SYFPEITHI دریافت کرده‌اند انتخاب شده‌اند. این اپی توپ‌ها در دیگر سرورهای مورد استفاده مشترک بوده و امتیازات بالایی گرفته‌اند. اگرچه تعیین نقشه‌ی اپی‌توپی آنتی‌ژن‌های مختلف در ایمونوانفورماتیک طی سال‌های اخیر به‌عنوان راهکاری نوین در عرصه‌ی طراحی واکسن‌های پپتیدی تلقی می‌شود اما پیش‌بینی نواحی اپی‌توپی با دقت ۱۰۰ درصد صورت نمی‌گیرد. علاوه بر این ممکن است نتیجه‌ی ارائه شده در ابزارهای ایمونوانفورماتیکی مختلف کاملاً یکسان نیست. از سوی دیگر برخی از این ابزارها از پایگاه داده‌های ساکن استفاده می‌کنند؛ لذا تعیین نقشه‌ی اپی‌توپی پروتئین‌های آنتی‌ژنیک بسیار جدید و یا تغییر یافته با چالش مهمی روبه‌روست؛ بنابراین علی‌رغم مزیت‌های متعدد پیش‌بینی نقشه‌ی اپی‌توپی اما به علت وجود خطاهای احتمالی نمی‌توان نتیجه‌ی ارائه شده در این بخش را کاملاً منطبق بر داده‌های تجربی دانست؛ اگرچه در اکثر موارد داده‌های به‌دست‌آمده هم‌راستا با داده‌های تجربی بوده‌اند (۲۸).

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که در پژوهش حاضر خروجی سرورهای پیش‌بینی کننده اپی توپ با کار انجام گرفته در آزمایشگاه مطابقت می‌کند و می‌توان در مسیر انتخاب واکسن برای ویروس HIV-1 مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان به علت حمایت مالی در انجام این تحقیق سپاس‌گزاری می‌نمایند ضمناً از مرکز تحقیقات حفظ سلامتی بریتانیا که این پپتیدها را ارسال کرده است نیز

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

تقدیر می‌نمایند.

منابع

1. Campbell KA, Lipinski MJ, Doran AC, Skaflen MD, Fuster V, McNamara CA. Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. Circ Res; 2012. 110:889-900.
2. Mohabatkar H. Prediction of epitopes and structural properties of Iranian HPV-16 E6 by bioinformatics methods. Asian Pac J Cancer Prev; 2007. 8:602-6.
3. Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, Vaneden W. A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity. Principles of Immunopharmacology. Virginia, Charlottesville: Springer; 2011. p. 15-27.
4. Korsholm KS, Karlsson I, Tang ST, Brandt L, Agger EM, Aagaard C, et al. Broadening of the T-cell repertoire to HIV-1 Gag p24 by vaccination of HLA-A2/DR transgenic mice with overlapping peptides in the CAF05 adjuvant. PloS one; 2013. 8:e63575.
5. Kulp DW, Schief WR .Advances in structure-based vaccine design. Curr Opin Virology; 2013. 3:322-31.
6. Lichterfeld M, Kaufmann DE, Xu GY, Mui SK, Addo MM, Johnston MN, et al. Loss of HIV-1–specific CD8+ T cell proliferation after acute HIV-1 infection and restorationby vaccine-induced HIV-1–specific CD4+ T cells. J Exp Med; 2004. 200:701-12.
7. Currier JR, Robb ML, Michael NL, Marovich MA. Defining epitope coverage requirements for T cell-based HIV vaccines: Theoretical considerations and practical applications j translational med; 2011. 9:1-16.
8. Li X, Xu W, Xiong S. A novel tuberculosis DNA vaccine in an HIV-1 p24 protein backbone confers protection against Mycobacterium tuberculosis and simultaneously elicits robust humoral and cellular responses to HIV-1. CLIN VACCINE IMMUNOL; 2012. 19:723-30.
9. Ma B, Maraj B, Tran NP, Knoff J, Chen A, Alvarez RD, et al. Emerging human papillomavirus vaccines.J GYN ONCOL; 2012. 17:469-92.
10. Hung CF, Ma B,Monie A, Tsen SW, Wu T. Therapeutic human papillomavirus vaccines: current clinical trials and future directions. Expert Opin Biol Ther; 2008. 8:421-39.
11. Deal C, Pekosz A, Ketner G. Prospects for oral replicating adenovirus-vectored vaccines. Vaccine; 2013. 31:3236-43.
12. Dasgupta G, Chentoufi AA, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L. New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. Expert Rev Vaccines; 2009. 8:1023-35.
13. Williams JG, Tomer KB, Hioe CE, Zolla-Pazner S, Norris PJ. The antigenic determinants on HIV p24 for CD4+ T cell inhibiting antibodies as determined by limited proteolysis, chemical modification, and mass spectrometry.J Am Soc Mass Spectr; 2006. 17:1560-69.
14. Steers NJ, Currier JR, Kijak GH, di Targiani RC, Saxena A, Marovich MA, et al. Cell type-specific proteasomal processing of HIV-1 Gag-p24 results in an altered epitope repertoire. Virology; 2011. 85:1541-53.
15. Zhang XW. A combination of epitope prediction and molecular docking allows for good identification of MHC class I restricted T-cell epitopes. Comput Biol Chem; 2013 Aug 31;45:30-5.
16. Chakraborty S, Rahman T, Chakravorty R. Characterization of the protective HIV-1 CTL epitopes and the corresponding HLA class I alleles: A step towards designing CTL based HIV-1 vaccine. Adv Vir; 2014 Mar 18. 2014.
17. Tong JC, Tan TW, Ranganathan S. Methods and protocols for prediction of immunogenic epitopes. Brief Bioinf; 2007. 8:96-108.
18. Bourdette D, Edmonds E, Smith C, Bowen J, Guttmann CR, Nagy Z, et al. A highly immunogenic trivalent T cell receptor peptide vaccine for multiple sclerosis. MULT SCLER; 2005. 11:552-61.
19. Lopez JA,Weilenman C, Audran R, Roggero MA, Bonelo A, Tiercy JM, et al. A synthetic malaria vaccine elicits a potent CD8+ and CD4+ T lymphocyte immune response in humans.
20. Implications for vaccination strategies. Eur J Immunol; 2001. 31:1989-98.
21. Knutson KL, Schiffman K, Disis ML. Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. J Clin Invest; 2001. 107:477-84.
22. Tsurui H, Takahashi T. Prediction of T-cell epitope. J Pharmacol Sci; 2007. 105:299-316.
23. Shaikh MSA. Genome based vaccine development in Burkholderia mallei through in silico identification of cell surface antigen. J Adv Bioinf App Res; 2012. 3:238-45.
24. Singh H, Raghava G. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics; 2001. 17:1236-37.
25. Dönnes P, Kohlbacher O. SVMHC: a server for prediction of MHC-binding peptides. NUCLEIC ACIDS RES; 2006. 34:194-7.
26. Rammensee H-G, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanović S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. Immunogenetics; 1999. 50:213-9.
27. Soni B, Seniya C, Misra R, Vyas V. immuno-informatic approach of in-silico tcell epitope prediction; Ijater 2013. 3:1-10.
28. Mahdavi M, Ebtekar M, Azadmanesh K,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

Khorramkhorshid H.R, Rahbarizadeh F, Yazdi M.H, et al. HIV-1 Gag p24-Nef fusion peptide induces cellular and humoral immune response in a mouse model. ACTA VIROL; 2010. 54:131-6.

29. Patronov A, Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. Open Biol; 2013. 3(1):120139.

30. Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, et al. Gagspecific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression. Immunol; 2007. 178: 2746-54.

31. Melhem NM, Smith KN, Huang XL, Colleton BA, Jiang W, Mailliard RB, et al.The impact of viral evolution and frequency of variant epitopes on primary and memory human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T cell reponses. Virology; 2014. 50-51:34-48.

32. Liu Y, Li F, Liu Y, Hong K, Meng X, et al. HIV fragment gag vaccine induces broader T cell response in mice. Vaccine; 2011. 29: 2582-89.

33. Poorinmohammad N, Mohabatkar H, Behbahani M. Computational prediction of anti HIV-1 peptides and in vitro evaluation of anti HIV-1 activity of HIV-1 P24-derived peptides. J Pep; Sci; 2014;21:10-16.

34. Bozzacco L, Yu H, Dengjel J, Trupmfheller C, A.Zebroski III H, Zhang N, et al. Strategy for identifying dendritic cell-processed CD4+ T cell epitopes from the HIV Gag P24 protein. Plos One; 2012. 7:e41897.

35. Doytchinova IA, Flower DR. Class I T-cell epitope prediction: Improvements using a combination of proteasome cleavage, TAP affinity, and MHC binding. Mol Immunol; 2006. 43: 2037-44.

36. Dick TP, Stevanovic S, Keilholz W, Ruppert T,Koszinowski U, Schild H, et al. The making of the dominant MHC class I ligand SYFPEITHI. Eur J Immunol; 1998. 28: 2478-86.

37. Altuvia Y, Berzofsky JA, Rosenfeld R, Margalit H. Sequence features that correlate with MHC restriction. Mol Immunol; 1994. 31:1-19.

38. Patronov A, Doytchinova I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. Open Biol; 2006. 3:120-39.

39. Tomar N, De RK. Immunoinformatics: a brief review Immunoinf; 2014:23-55.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]

T-cell epitope prediction of HIV-1 P24 protein and evaluation of their effect on human lymphocyte proliferation in Iran

Arash Rahmani, MSc in Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran. arash.rahmani23@gmail.com
***Hassan Mohabatkar**, PhD, Associate Professor of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran (*Corresponding author). h.mohabatkar@ast.ui.ac.ir
Mandana Behbahani, PhD, Assistant Professor of Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran. ma_behbahani@yahoo.com
Mokhtar Nosrati, MSc in Microbial Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran. mokhtar.nosrati@ast.ui.ac.ir

Abstract

Background: Recently, with the advances in the medicine of boosting the immune system, high ability of peptides for the treatment of viral diseases has been proved. By now, there is no effective vaccine against HIV-1 infection. Previous studies confirmed the efficiency of capsid and envelope proteins of papilloma, Herpes and Adeno viruses in new vaccines design. The present study was planned to predict T-cells epitopes from P24 protein by bioinformatics tools and study their effects on lymphocyte proliferation.
Methods: To this aim, sequences of 22 peptides corresponding to P24 protein were obtained from NIBSC and have been examined using HLAPred, Propred, SVMHC, SYFPEITHI and IEDB server. In this experiment, the peptides were prepared at concentrations of 10,100, 500 and 1,000µg/ml. At the end, the selected peptides were tested on the Iranian blood lymphocyte cells (PBMC).
Results: The results demonstrated that positive peptides significantly increased lymphocyte proliferation. However the negative peptides did not have any effect on lymphocyte proliferation. Results also showed that p16 and p3 among tested peptides had highest and lowest effects on lymphocytes proliferation, respectively.
Conclusion: The results of present study confirmed that epitope predictions tools can be reliable alternatives to experimental work.

Keywords: Epitope, HIV-1, T lymphocyte, P24

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-05-31]